

- De Serres F. J. Studies with purple adenine mutants in *N. crassa*. V. Evidence for allelic complementation among ad-3B mutants. — *Genetics*, 1963, vol. 48, No 3, p. 351—360.
- De Serres F. J. The utilization of leaky ad-3-mutants of *N. crassa* in heterokaryon tests for allelic complementation. — *Mutation res.*, 1966, vol. 3, No 1, p. 3—12.
- De Serres F. J., Brockman H. E., Barnett W. E., Kolmark H. G. Allelic complementation among nitrous acid-induced ad-3B mutants of *N. crassa*. — *Mutation res.*, 1967, vol. 4, p. 415—424.
- Shin Lin, Villarejo M., Zabin I. β — galactosidase: α — complementation of a deletion mutants with cyanogen bromide peptides. — *Biochem. biophys. res. comm.*, 1970, vol. 40, No 2, p. 249—254.
- Simarov B. V., Mironova L. N., Inge-Vechtomov S. G. Nonsense-missense suppression in yeast. — *Molec. and gen. genet.*, 1971, vol. 113, p. 302—307.
- Smith B. R. Interallelic recombination at the his-5 locus in *Neurospora crassa*. — *Heredity*, 1935, vol. 20, pt. 2, p. 267—276.
- Tessman J. Genetic ultrafine structure in the T4 *rII* region. — *Genetics*, 1965, vol. 51, No 1, p. 63—75.
- Woods R. A., Bevan E. A. Interallelic complementation at the ade-2 locus of *S. cerevisiae*. — *Heredity*, 1966, vol. 21, No 1, p. 121—130.
- Woodward D. O. Enzyme complementation in vitro between adenylosuccinase-less mutants of *Neurospora crassa*. — *Proc. nat. acad. sci. USA*, 1959, vol. 45, p. 846—850.
- Woodward V. W. Complementation and recombination among pyr-3 heteroallelic of *Neurospora crassa*. — *Proc. nat. acad. sci. USA*, 1962, vol. 48, p. 348—356.
- Woodward D. O., Partridge C. W. H., Giles N. H. Complementation at ad-4 locus in *Neurospora crassa*. — *Proc. nat. acad. sci. USA*, 1958, vol. 44, p. 1237—1244.
- Yanofsky C. The triptophan synthetase system. — *Bacteriol. revs.*, 1960, vol. 24, No 2, p. 221—245.
- Yanofsky C., Carlton B. C., Guerst J. R., Helinski D. R., Henning U. On the colinearity of gene structure and protein structure. — *Proc. nat. acad. sci. USA*, 1964, vol. 51, p. 266—272.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ ПО ВЕРОННОЙ КАРТЕ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ ЛОКУСА *ADE₂* У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Т. Р. Сойдла

Кафедра генетики и селекции ЛГУ

А. М. Коваль

Институт микробиологии и вирусологии АН УССР

В наших предыдущих работах (Сойдла, Инге-Вечтомов, Симаров, 1967; Коваль и Сойдла, 1972, 1973) был изложен способ построения упрощенных карт комплементации, так называемых веронных карт. Было описано построение веронной карты для 411 мутаций, индуцированных разными мутагенами в локусе *ade₂*, и рассмотрены ее основные свойства. Оказалось, что форма веронной карты мало зависит от конкретного набора мутаций, использованных для ее построения, и, следовательно, должна отражать некоторые основные закономерности соответствия локуса *ade₂* и фермента АИР-карбоксилазы. В тех же работах веронная карта комплементации позволила выявить специфичность разных мутагенов, использованных для получения коллекции мутантов по локусу *ade₂*. В настоящем сборнике (Инге-Вечтомов, Попова, Гуковский, Кривов, 1973) сообщается о коллинеарности карты рекомбинации и комплементационной карты локуса *ade₂*. Это позволяет нам соотносить данные комплементационного анализа со структурой самого локуса *ade₂*.

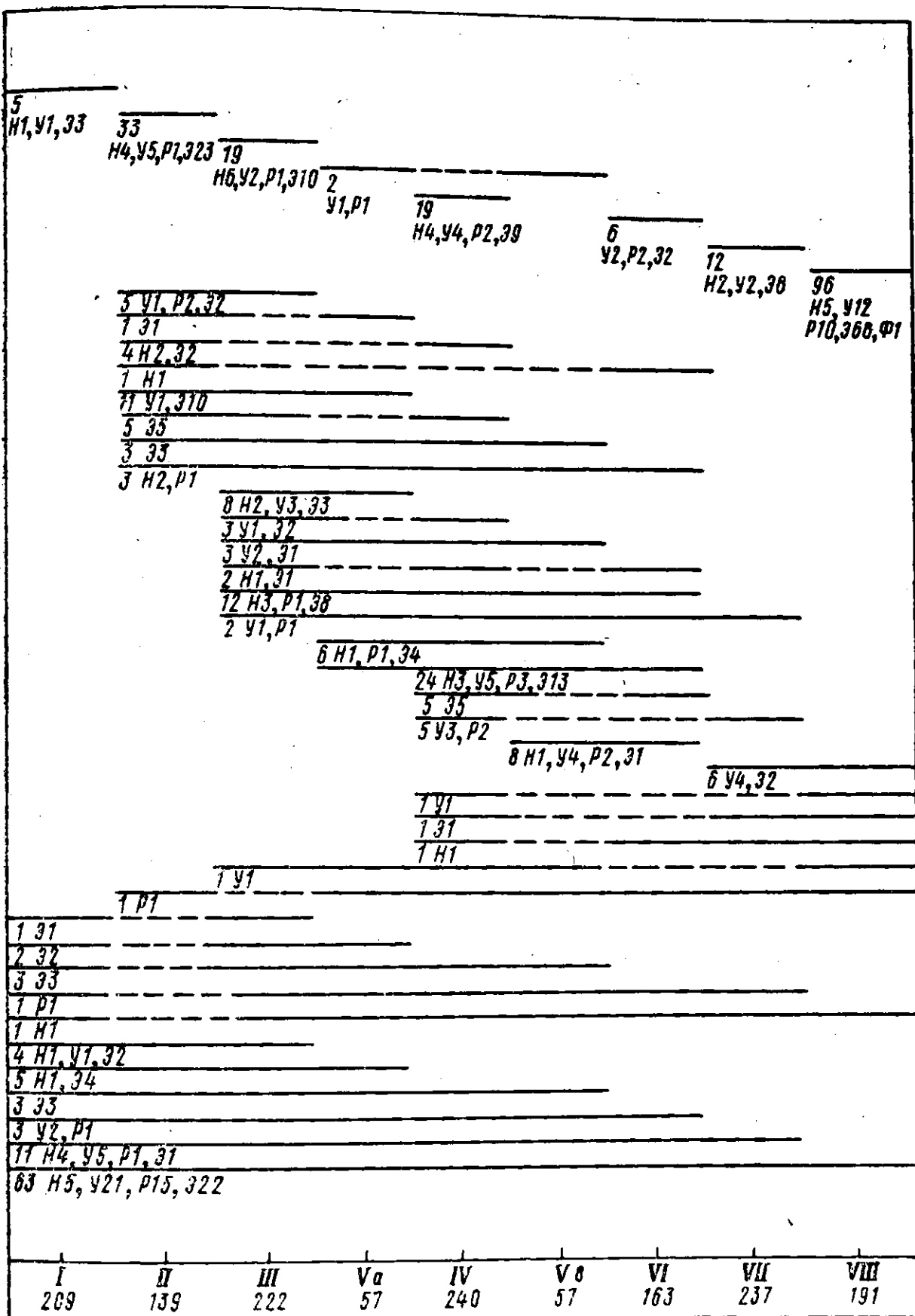


Рис. 1. Веронная карта комплементации локуса *ade2*.

Под каждой линией указано число мутаций, занимающих данную группу комплементации. Н-мутации, индуцированные HNO_3 , У-мутации, индуцированные УФ-лучами, Р-мутации, индуцированные рентгеновыми лучами, Э-мутации, индуцированные этилметансульфонатом. Номера мутаций *ade2*, занимающих ту или иную группу комплементации, приведены в работе (Коваль и Сойдла, 1972).

На рис. 1 приведена веронная карта комплементации локуса. Все соответствующие экспериментальные детали, равно как и полный список аллелей, имеющих тот или иной тип комплементации, приведены нами ранее (Коваль, Сойдла, 1972). В свое время (Коваль, Сойдла, 1973) мы показали распределение мутаций, индуцированных разными мутагенами, по веронам этой карты. Распределение оказалось несколько различным для разных мутагенов. Эти различия касались количества мутаций, индуцированных в горячем пятне — группе комплементации, перекрывающей только VIII верон. Еще некоторые различия были

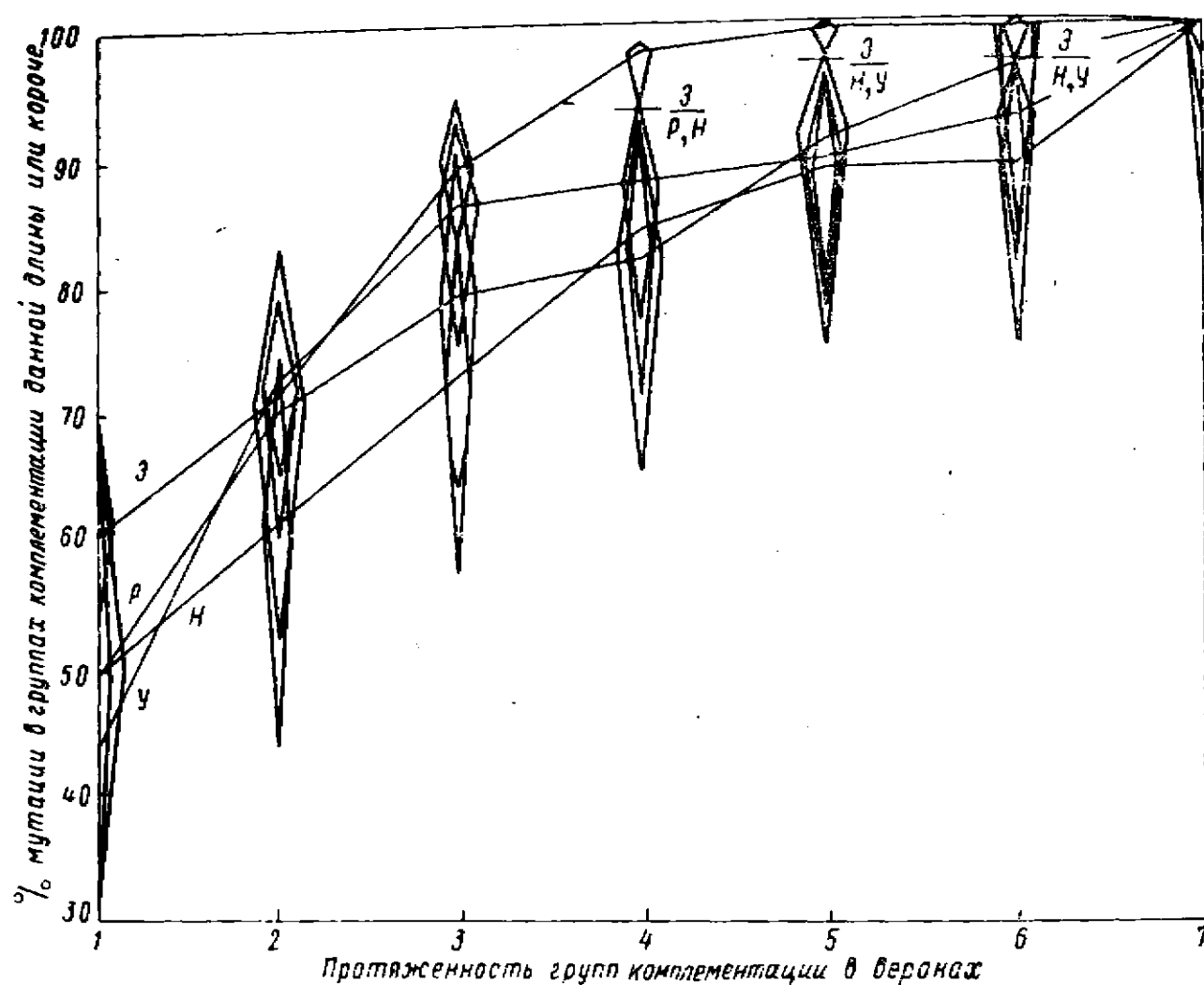


Рис. 2. Длина линий, изображающих мутации, индуцированные разными мутагенами.

Горизонтальные линии с обозначениями мутагенов, например $\frac{Z}{P, H}$, изображают достоверные различия между мутагенами в индукции мутаций, занимающих группы комплементации данной длины или короче. Обозначения мутагенов те же.

найжены при суммировании частот мутаций по нескольким соседним веронам. (Коваль, Сойдла, 1973). Как и некоторые другие авторы (De Serres, Brockman, Barnett, Kolmark, 1971), мы нашли различие в средней длине линий, изображающих мутации, индуцированные разными мутагенами (рис. 2, таблица), но разница эта исчезла, когда мы исключили из рассмотрения полярные группы комплементации, имеющие происхождение от мутаций-нонсенсов и, может быть, и от мутаций типа «сдвиг считывания» (Сойдла, Инге-Вечтомов, Симаров, 1967; Инге-Вечтомов, 1971). Следовательно, истинные миссенс-мутации, индуцированные всеми использованными мутагенами, вызывают примерно одинаковые по величине повреждения в белковой молекуле, но расположение этих повреждений по локусу несколько различно.

Не может не бросаться в глаза, что общее распределение мутаций, индуцированных разными мутагенами по локусу *ade₂*, тем не менее

Распределение комплементирующих мутаций, индуцированных разными мутагенами, на группы комплементации разной протяженности

Мутации	Мутагены	Количество мутаций, изображаемых линией данной протяженности (в веронах)							Кол-во мутаций	Средняя длина группы	Ошибка, t
		1	2	3	4	5	6	7			
Все	HNO ₂	22	5	5	5	2	0	5	44	2,55	0,3
	УФ-лучи	29	19	9	1	1	2	5	66	2,27	0,22
	Рентг. лучи	17	7	3	1	3	2	1	34	2,29	0,3
	ЭМС	123	23	35	18	3	0	1	203	1,81	0,08
Без по- лярных	HNO ₂	22	5	4	4	2	0	1	38	2,03	0,25
	УФ-лучи	29	19	8	1	1	0	0	58	1,72	0,12
	Рентг. лучи	17	7	3	1	3	1	0	32	2,03	0,26
	ЭМС	123	23	33	14	0	0	0	193	1,68	0,072

$t = 2,0$ } $t = 2,3$
 Все разницы
 недостоверны

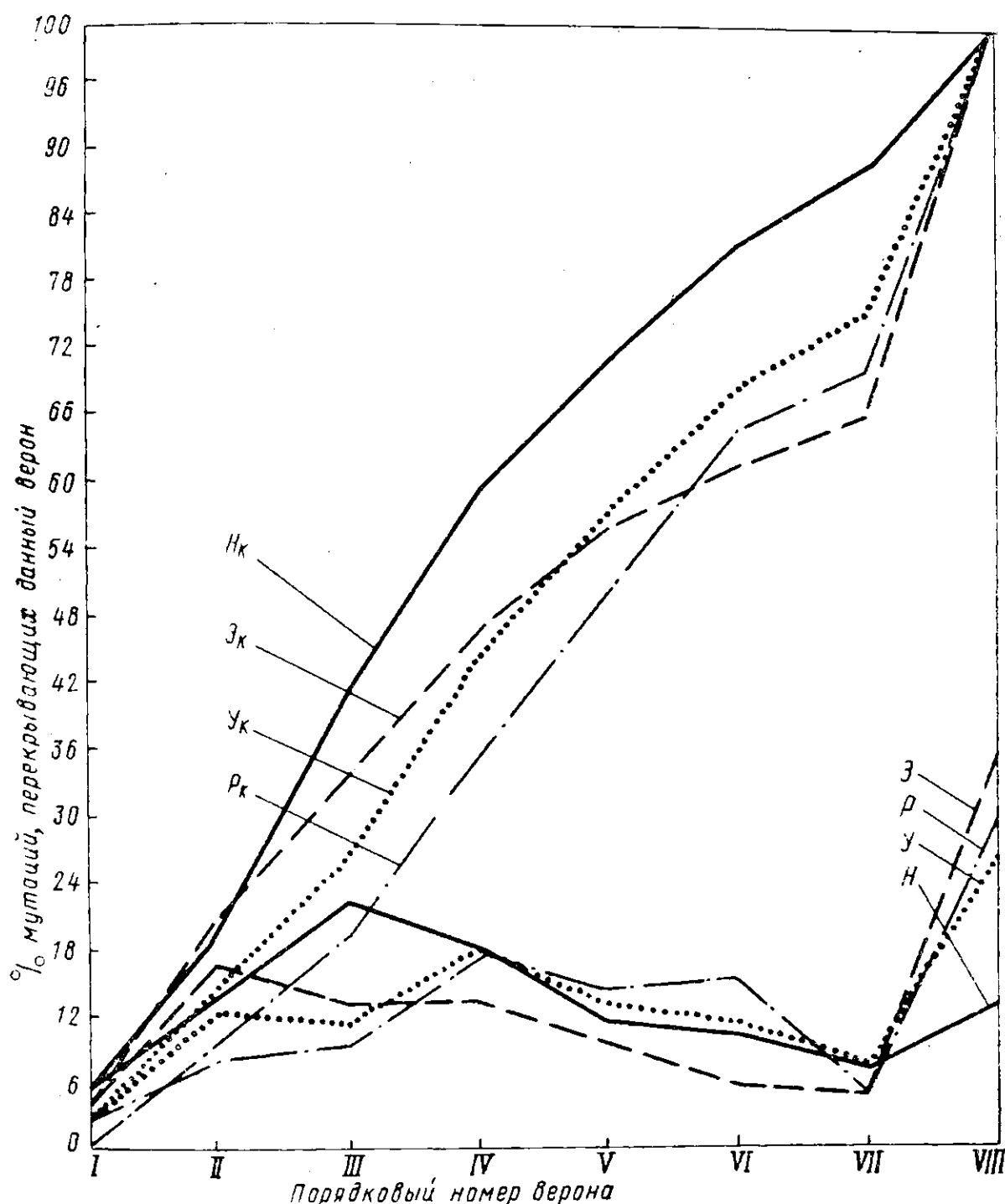


Рис. 3. Распределение мутаций, индуцированных разными мутагенами по веронам.

Если линия, изображающая мутацию, перекрывает n веронов, считается, что имеется $1/n$ данной мутации на каждый верон. Верхние кривые (к обозначению мутагена добавлен индекс „k“) изображают, сколько мутаций, индуцированных данным мутагеном, перекрывает данный верон или находится левее данного верона. Обозначения мутагенов те же.

весьма сходно (рис. 3). Для всех мутагенов в первых 7 веронах кривая распределения в первом приближении похожа на нормальную кривую распределения. Затем следует горячее пятно VIII верона. Эта особенность распределения должна отражать некоторое отношение локуса *ade₂* к своему продукту — АИР-карбоксилазе, независимое от происхождения исследуемого набора мутаций. Простое соображение это определило наш интерес к общему распределению мутаций на карте комплементации *ade₂*.

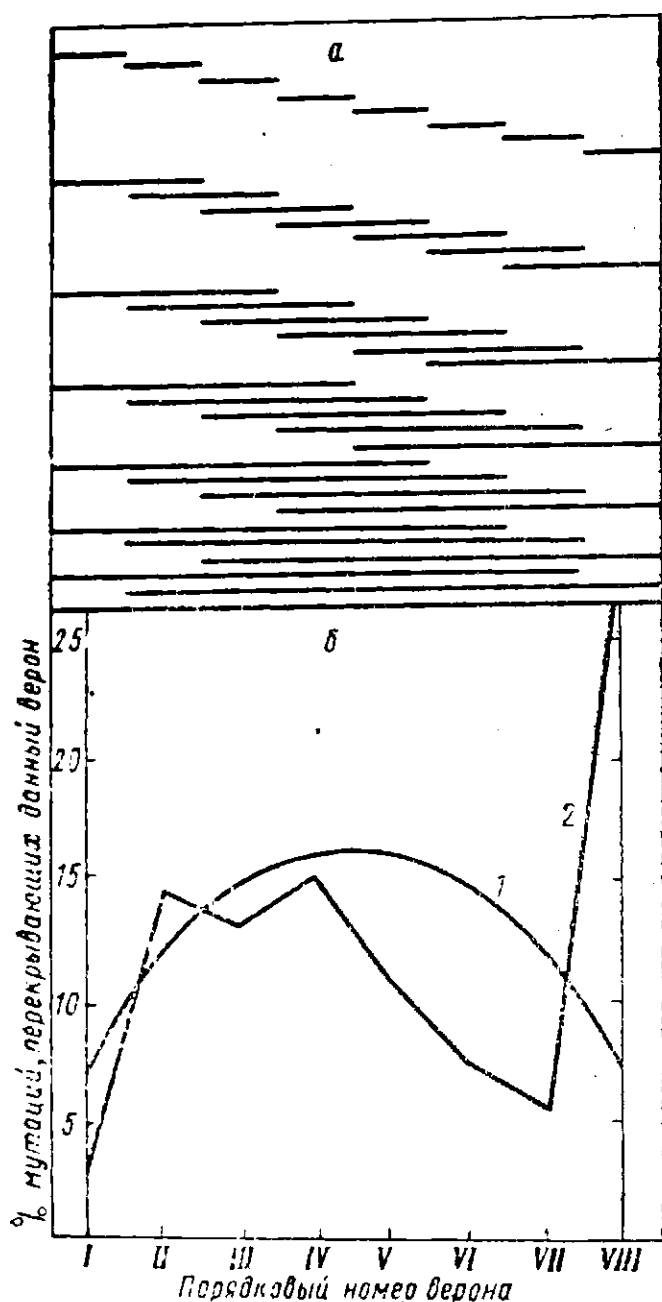


Рис. 4. Распределение мутаций по карте комплементации идеализированного локуса и локуса *ade₂*.

а — 8-веронная карта комплементации, на которой все группы комплементации заняты; б: 1 — распределение мутаций по «идеальной» веронной карте при условии, что все группы карты заняты одинаковым количеством мутаций; 2 — распределение мутаций по 8 веронам карты комплементации локуса *ade₂*. Если мутация занимает *n* веронов, считается, что имеется 1/*n* мутации на каждый занятый верон.

признать, что колоколообразная форма кривых распределения мутаций по веронной карте локуса *ade₂* проистекает уже из факта преимущественной линейности этой карты.

С другой стороны (см. рис. 1), можно убедиться, что само распределение мутаций по одноверонным группам далеко не равномерно. Как нами было показано ранее (Коваль, Сойдла, 1973), распределение мутаций по группам комплементации действительно близко к пуассоновому, как требует вышеприведенная модель, но имеются и отдельные

Близкое к нормальному распределение мутаций в левой части рис. 3 вызывает на первый взгляд удивление, поскольку на имеющихся больших рекомбинационных картах гена (Benzer, 1961; Leopold a. Gutz, 1965) подобной закономерности не наблюдается, да и странно предположить что-то подобное, исходя из современных представлений о мутагенезе и структуре гена. В действительности же подобный ход кривых проистекает уже из общей линейности карты комплементации *ade₂*, показанной нами недавно (Коваль, Сойдла, 1972). Действительно, на линейной карте комплементации невозможны многие группы комплементации, объединяющие разные вероны. Выпишем все группы комплементации, возможные на линейной 8-веронной карте. Их 35. Считаем, что каждую группу занимает одинаковое количество мутаций. Тогда распределение мутаций по длине карты комплементации образует кривую, близкую кривой нормального распределения (рис. 4). В то же время распределение мутаций по рекомбинационной карте, как легко можно убедиться, может быть весьма равномерным. Тем самым приходится

«горячие группы» комплементации. Также видно, что распределение мутаций по локусу сдвинуто влево (рис. 3, 4). Все это затрудняет содержательную аппроксимацию реального распределения мутаций по локусу *ade₂* кривой рис. 4. Тем не менее казалось заманчивым пытаться свести кривые распределения рис. 3 к одной простой зависимости. Для поисков такой гипотетической зависимости мы использовали так называемую вероятностную бумагу, т. е. бумагу, где по одной из осей

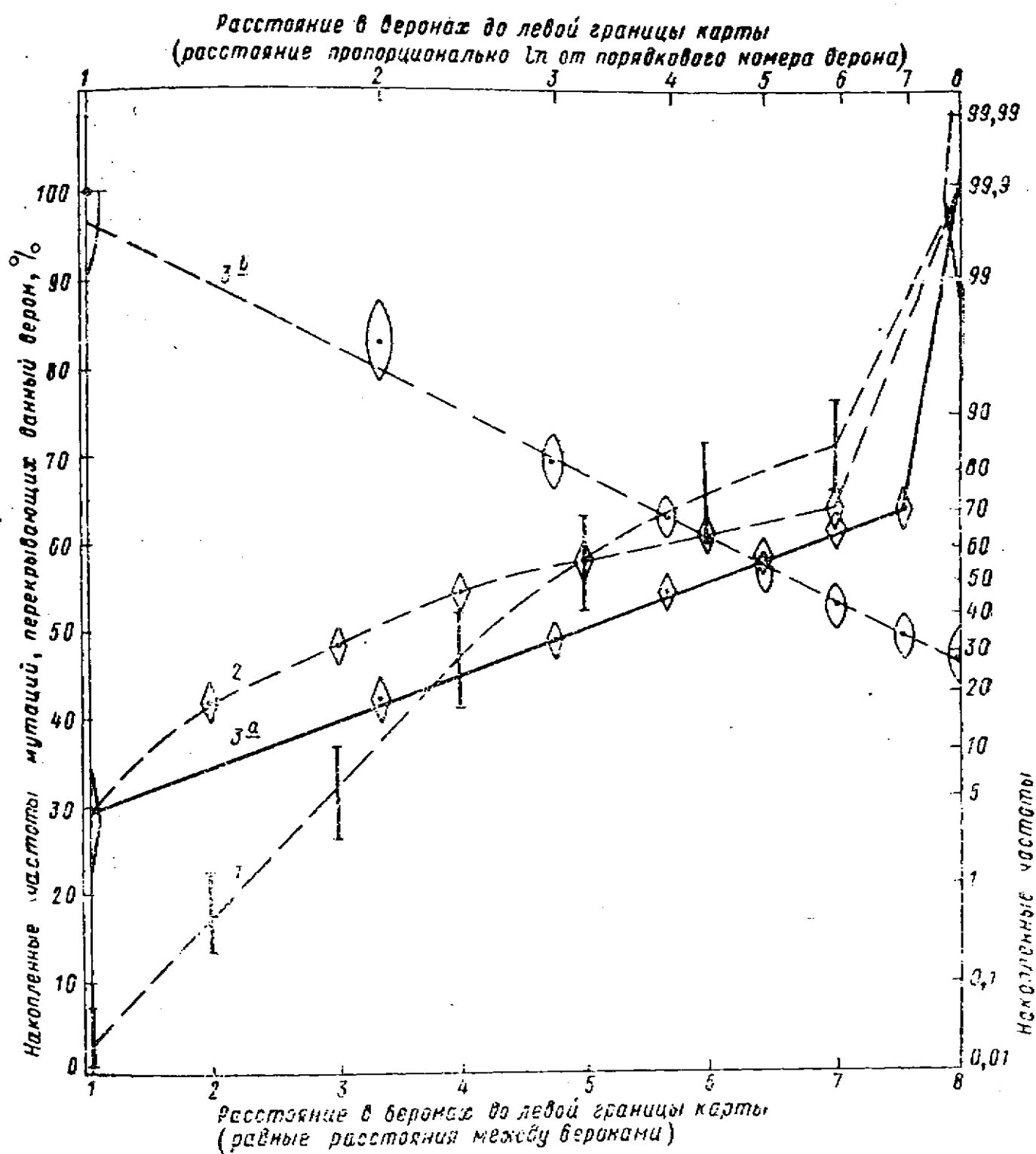


Рис. 5. Кумулятивные кривые распределения мутаций по веронам.

1 — расстояния между веронами предполагаются равными, накопленные частоты — по левой шкале; 2 — расстояния между веронами предполагаются равными, накопленные частоты — по правой шкале. В случаях 1 и 2 суммирование ведется со стороны I верона; 3 — расстояния между веронами по логарифмической шкале, накопленные частоты — по правой шкале: а — суммирование ведется от I верона; б — суммирование ведется от VIII верона.

отложен интеграл вероятности нормального распределения, выраженный в долях, другая ось разделена равномерно и служит для градации исследуемого показателя. Важно, что кумулятивные частоты нормального распределения, занесенные на эту бумагу, ложатся на прямую линию (Sokal, Rohlf, 1969).

На рис. 5 даны несколько кумулятивных кривых, изображающих распределение мутаций по карте комплементации *ade₂*. «Контрольная кривая» изображает кумулятивные распределения мутаций по веронам против равномерной шкалы, аналогичной таковой на рис. 3. Когда то же распределение изображается по шкале долей интеграла вероятностей, видно, что кривая не выпрямляется, т. е. распределение мутаций даже по участку 1—7 верона достоверно отличается от нормального, что не удивительно в виду явной асимметричности кривой на рис. 3. Весьма удивительным было, что простая замена равных расстояний между веронами логарифмом порядкового номера верона (т. е. фактически логарифмом расстояния от левого края локуса) дало почти идеальную прямую для первых 7 веронов. Контрольное суммирование частот, начиная от правого края локуса (выпадает горячее пятно), находится также в весьма хорошем согласии с прямолинейным характером найденной зависимости.

Полученная простая закономерность, точно описывающая распределение мутаций, вызывает много вопросов. Действительно ли различаются по размерам участки гена *ade₂*, соответствующие веронам? Если да, то мы могли бы предположить, что АИР-карбоксилаза заворачивается в какое-то подобие логарифмической спирали, начиная с того участка полипептидной цепи, который транслируется в первую очередь (Сойдла, Инге-Вечтомов, Симаров, 1967). Возможно также, что участки локуса *ade₂*, отвечающие веронам, более или менее равновелики, но отличаются по мутабельности. В этом случае левые 7/8 локуса характеризовались бы уникальным градиентом мутабельности, и это заставляло бы предполагать косвенное воздействие всех исследованных мутагенов на локус. Наиболее правдоподобным кажется все же объяснение, что повреждения, вызванные мутациями, попросту имеют тенденцию распространяться налево, а не направо по карте комплементации. Можно было бы подозревать, что за наблюдаемый эффект отвечают одни полярные мутации, но после вычета этой группы мутаций линейная зависимость частоты мутаций от логарифма расстояния в пределах первых 7 веронов остается в силе (рис. 6). Поэтому кажется разумным предположить, что само укладывание полипептидной цепи АИР-карбоксилазы направлено, происходит в том же направлении, что и трансляция, сдвигает повреждение преимущественно в одну сторону от измененной точки в полипептиде, и тем самым группы комплементации оказываются сдвинутыми влево по комплементационной карте.

Мы пытались также выпрямлять кривую кумулятивных частот, выбирая расстояния между веронами, согласно рекомбинационной карте локуса *ade₂* (Инге-Вечтомов, Попова, Гуковский, Кривов, 1974) (рис. 6). Для первых 5 веронов она действительно выпрямилась, но дальнейший ход кривой оказывался сложным, (отметим, что рекомбинационная карта дает порядок веронов 1 2 3 5 4 6 7 8, и поэтому кумулятивные частоты для 5-го и 4-го веронов оказываются иными, чем на графиках, приведенных выше). Более реалистическая модель (рис. 7) учитывала факт, что мутации, изображаемые линиями, перекрывающими данный верон, могли иметь место как слева, так и справа от соответствующей точки на рекомбинационной карте, причем чем дальше от точки, тем реже.

Размером мишени (характеристикой вероятности получать мутации, перекрывающие данный верон) мы выбрали в каждом случае геометрическую среднюю от расстояний до сайтов, занятых представителями соседних веронов. (В случае первого и восьмого веронов второй границей служили крайние картированные мутации локуса *ade₂*). Если изобразить расстояния между веронами величинами соответствующих

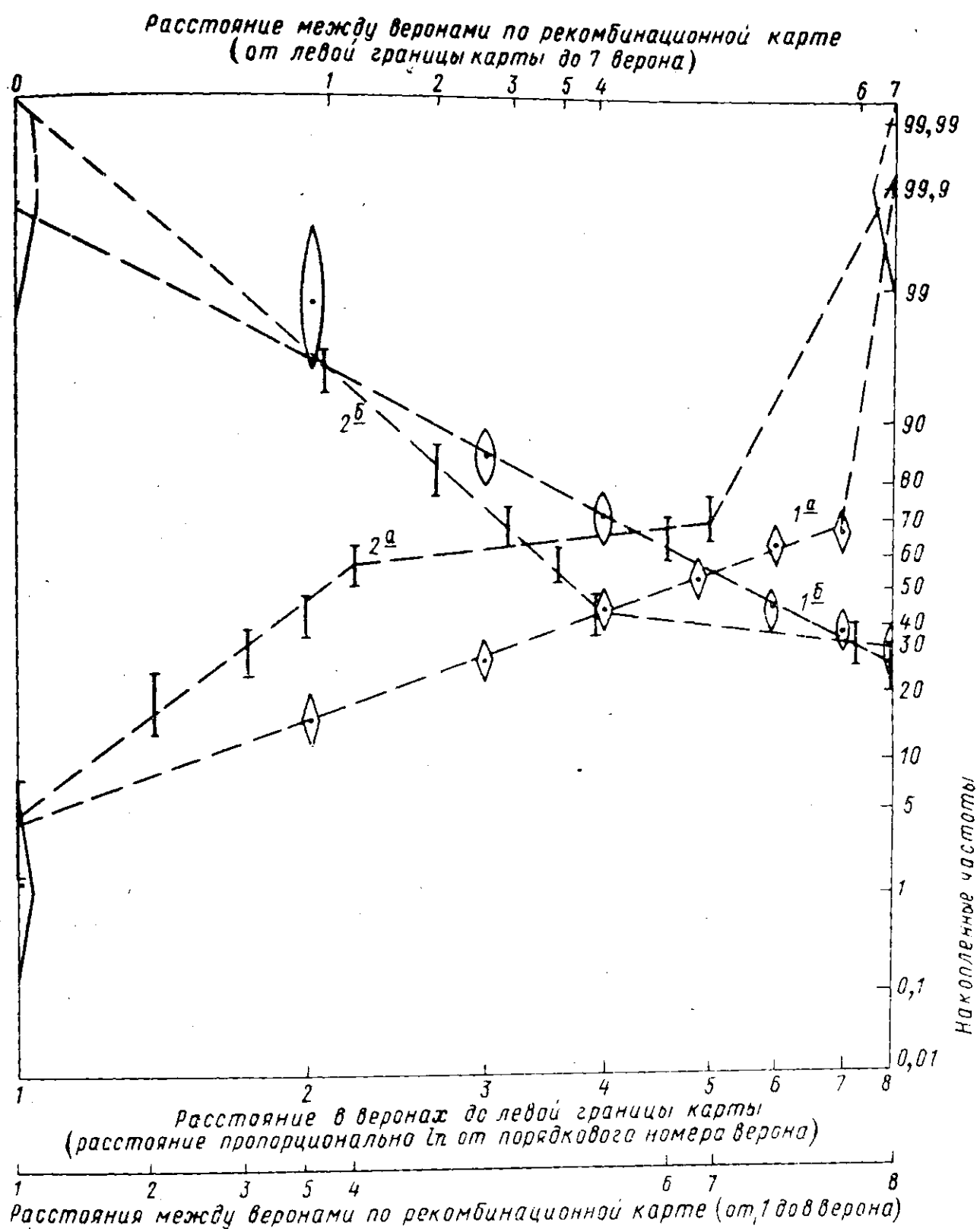


Рис. 6. Кумулятивные кривые распределения мутаций по 8 веронам.

1 — из выборки учтенных мутаций исключены мутации, изображаемые полярными группами комплементации или полярными группами с разрывом: а — суммирование ведется со стороны 1 верона; б — суммирование ведется со стороны VIII верона. Расстояния между веронами по логарифмической шкале; 2 — выборка захватывает все комплементирующие мутации. Расстояния между веронами пропорциональны расстояниям мутаций, занимающих эти вероны, по рекомбинационной карте: а — суммирование ведется со стороны 1 верона; расстояния по нижней рекомбинационной шкале; б — суммирование ведется со стороны VIII верона; расстояния по верхней рекомбинационной шкале. 0 — самая левая по карте полярная мутация считается маркером левой границы локуса.

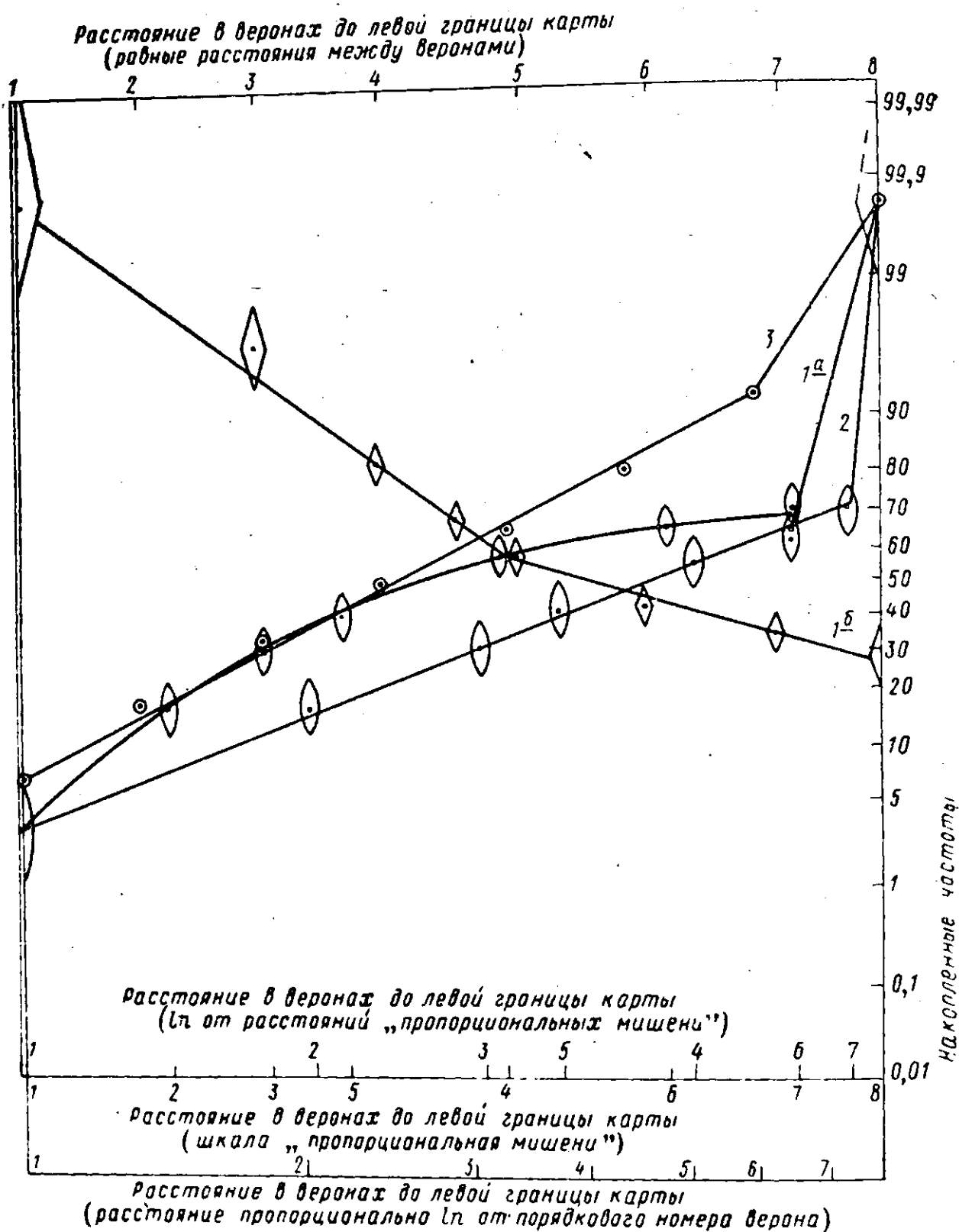


Рис. 7. Кумулятивные кривые распределения мутаций по веронам.

1 — расстояния между веронами пропорциональны оценке мишени для верона, находящегося справа от интервала: а — суммирование ведется со стороны I верона; б — суммирование ведется со стороны VIII верона; 2 — расстояния между веронами пропорциональны логарифму дистанции до левого края локуса, вычисленного по оценкам мишени; 3 — распределение мутаций по веронам для идеального локуса. Расстояния между веронами равные. В случаях 2 и 3 суммирование ведется со стороны I верона. Для сравнения дана шкала „ln от порядкового номера верона“.

мишеней, получается весьма плавная кривая распределения от 1-го до 7-го верона.

Введем преимущественный сдвиг мутационного повреждения влево извлечением логарифма от расстояния до левого края локуса (в тех же единицах «мишеней»). Получается хорошая прямолинейная зависимость, которая не сводится тривиально к повторению простой модели рис. 5. Действительно, расстояния, найденные для прямолинейной зависимости на рис. 7, не сводятся к логарифмической шкале рис. 5.;

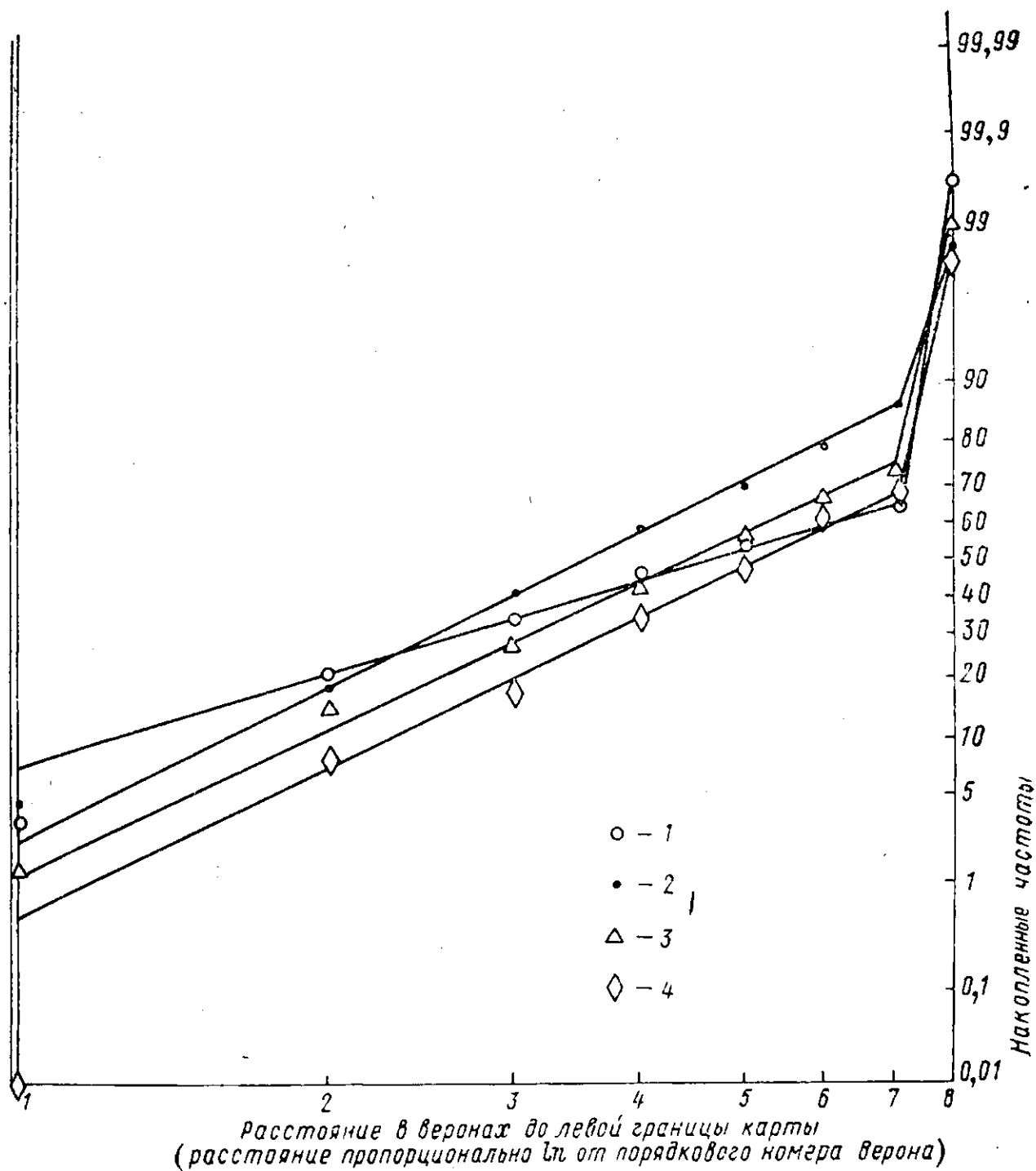


Рис. 8. Кумулятивные кривые распределения мутаций, индуцированных разными мутагенами по локусу *ade*.

Расстояния между веронами по логарифмической шкале. Суммирование ведется со стороны 1 верона. 1 — мутации, индуцированные ЭМС; 2 — мутации, индуцированные HNO_3 ; 3 — мутации, индуцированные УФ-лучами; 4 — мутации, индуцированные рентгеновыми лучами. Все отклонения кривых от экспериментальных точек в пределах I—VIII веронов не выходят за пределы 95% доверительного интервала.

изменению порядка 4 и 5 веронов на рис. 7 соответствует нарушение убывающей последовательности расстояний на месте 4 и 5 веронов.

Успешное нахождение простой зависимости между рекомбинационной картой и распределением мутаций по локусу свидетельствует в пользу гипотезы о направленном укладывании полипептидной цепи АИР-карбоксилазы. Также становится вероятным, что карта рекомби-

нации локуса (Инге-Вечтомов, Попова, Гуковский, Кривов, 1974) действительно изображает не только порядок, но и (хотя, вероятно, и грубо) расстояние между мутациями локуса *ade₂* (Yanofsky, Draplan, Guest, Carlton, 1967).

Мы проверили также нормальность распределения мутаций на карте комплементации идеального локуса (см. рис. 4, 7). Можно убедиться, что распределение это существенно близко к нормальному, давая исключения только по краям локуса. Тем самым вероятно, что модель рис. 4, объясняющая возникновение нормального распределения на карте комплементации, вместе с гипотезой о направленном укладывании полипептидной цепи служит (со всеми оговорками) содержательным объяснением кривых, построенных в работе.

В заключение (рис. 8) мы изобразили кумулятивные кривые распределения мутаций, индуцированных всеми 4 использованными мутагенами отдельно, используя выпрямляющую логарифмическую шкалу рис. 5. Можно убедиться, что все кривые распределения аппроксимируются в интервале 1—7 верона прямыми, хотя распределение мутаций, индуцированных ЭМС, отчетливо отличается от таковой для других мутагенов.

Выводы

1. Найдены два способа простого описания распределения мутаций по карте комплементации *ade₂*.

2. Выдвинута гипотеза, интерпретирующая общий характер распределения мутаций по карте комплементации *ade₂* как приблизительно равномерное распределение мутаций по группам комплементации линейной карты, где направленное укладывание полипептидной цепи сдвигает мутационные повреждения в направлении, совпадающем с направлением трансляции локуса.

Summary

The distribution of mutations induced by different mutagens in *ade₂* locus of *Saccharomyces* yeast has been studied. The two ways of simple description of distribution of the mutations on the locus has been found. A hypothesis to explain the distribution of mutations has been proposed.

ЛИТЕРАТУРА

- Инге-Вечтомов С. Г. Структура, функция и взаимодействие генов у дрожжей. Автореф. докт. дис. Л., 1971. 46 с.
- Инге-Вечтомов С. Г., Попова И. А., Гуковский Д. И., Кривов В. Н. Рекомбинация и комплементация в локусе *ade₂* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1974, вып. 5, с. 35—48.
- Коваль А. М., Сойдла Т. Р. Межаллельная комплементация мутаций, индуцированных в локусе *ade₂* у дрожжей-сахаромикетов. I. Построение веронной карты комплементации. — «Цитология и генетика», 1972, т. 6, № 6, с. 497—499.
- Коваль А. М., Сойдла Т. Р. Межаллельная комплементация мутаций, индуцированных в локусе *ade₂* у дрожжей-сахаромикетов. II. Специфичность действия этилметансульфоната. — «Цитология и генетика», 1973, т. 7, № 2, с. 144—149.
- Сойдла Т. Р., Инге-Вечтомов С. Г., Симаров Б. В. Межаллельная комплементация в локусе *ade₂* у дрожжей. — В кн.: Исследования по генетике. Под ред. М. Е. Лобашева. Л., 1967, вып. 3, с. 148—164.
- Benzel S. On the topography of the genetic fine structure. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1961, vol. 47, No 3, p. 403—416.
- Leupold U., Gutz H. Genetic fine structure in *Schizosaccharomyces*. — Genetics today. Proc. XI Int. Congr. Genet. The Hague e. a., 1965, vol. 2, p. 31—35.
- De Serres F. J., Brockmann H. E., Barnett W. E., Kolmark H. G. Mutagen specificity in *Neurospora crassa*. — Mutation res., 1971, vol. 12, No 2, p. 129—142.
- Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry. San Francisco, 1969, XXII+776 p.
- Yanofsky C., Draplan G. R., Guest J. R., Carlton B. C. The complete amino acid sequence of the tryptophan synthetase A protein subunit and its co-linear relationship with the genetic map of the A gene. — Proc. nat. acad. sci. USA, 1967, vol. 57, No 2, p. 296—298.